Quick Protocol

آماده سازی واکنش PCR برای HLA B-5 و HLA B-51

2022 ROJETechnologies, all rights reserved

مراحل کار

آماده سازی واکنش PCR برای HLA B-5 و HLA B-51

- مقدار ۶ میکرولیتر از Master Mix B-5, B51 را درون میکروتیوب اضافه کنید.
- مقدار ۲/۷ میکرولیتر از Primer Mix B-5 یا مقدار ۲/۷ میکرولیتر از Primer Mix B-51 را اضافه کنید.
- ۱۰۰–۵۰۰ نانوگرم از نمونه خود را درون هر میکروتیوب اضافه کنید. سپس تا حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر آب نوکلئاز فری اضافه کرده، سپس پیپتاژ کنید (جدول ۱ و ۲).

نکته: از DNA با غلظت پایینتر استفاده نکنید.

- محلول داخل میکروتیوب را اسپین کنید و درهای تیوب ها را ببندید یا اگر از پلیت استفاده می کنید، با استفاده از فویل چسبدار PCR، پلیت را کامل سیل کنید.
- پلیت/ میکروتیوب را درون دستگاه ترموسایکلر قرار دهید و برنامه را اجرا کنید (جدول ۳ را ببینید).

جدول ۱: آماده سازی واکنش PCR برای HLA B-5

Component	Volume (1 Reaction)
B-5 Master Mix, 2X	6µl
B-5 Primer Mix	2.7µl
Sample	100-500ng
ddH2O	To 12µl
Final Volume	12µl

جدول ۲: آماده سازی واکنش PCR برای HLA B-51

Component	Volume (1 Reaction)
B-51 Master Mix, 2X	6µl
B-51 Primer Mix	2.7µl
Sample	100-500ng
ddH2O	To 12µl
Final Volume	12µl

جدول ۳: برنامه PCR برای HLA B-5 و HLA B-51

Cycles	Step Name	Temperature	Duration
-	Initial Incubation	25°C	3min
-	Initial Denaturation	96°C	2min
10 Cycles	Denaturation	94°C	10sec
	Annealing	65°C	1min
20 Cycles	Denaturation	94°C	10sec
	Annealing	61°C	50sec
	Extension	72°C	30 sec
- -	Final Extension	72°C	5min
-	Store	4°C	----

آگارز ژل الکتروفورز

محصولات PCR با استفاده از آگارز ژل الکتروفورز و سپس تشخیص باند های DNA توسط نور UV، شناسایی می شوند.

آماده سازی ژل آگارز ۲ ٪ (وزنی/حجمی)

- ۲ گرم از پودر آگارز را در ۱۰۰ میلی لیتر از بافر TAE, 1X حل کنید (TAE, 10X, Filtered, Sterile, Molecular Cat NO: BU983104).
- پودر آگارز بایستی به طور کامل توسط جوشیدن در مایکروویو و یا روی دستگاه هیتر، ذوب شود. بطور مداوم به هم بزنید. اگر تبخیری رخ داد، دوباره با آب نوکلئاز فری پر کنید.

ریختن ژل داخل سینی

- ژل آگارز گرم شده را تا دمای ۶۰ درجه سانتی گراد سرد کنید.
- حداقل ۲ میکرولیتر Safe Stain را به آگارز اضافه کنید. تا زمانی که Safe Stain کاملا مخلوط شود، هم بزنید.
- روی یک سطح متعادل، سینی ژل همراه با شانه را قرار دهید.
- به اندازه ای که ضخامت ژل ۵ میلیمتر باشد، ژل داخل سینی بریزید.
- اجازه دهید ژل ببندد.

آگارز ژل الکتروفورز

- ژل را در بافر TAE,1X درون الکتروفورز، قرار دهید.
- به آرامی در میکروتیوب را بازکنید.
- ۵ تا ۸ میکرولیتر از محصول PCR را درون هر یک از چاهک های روی ژل، ران کنید.

نکته: محصـــولات PCR مربوط به HLA B-5 و HLA B-51 با Cresol red رنگدار شـــده اند. نیازی به "Loading buffer" یا رنگ اضافی نمی باشد.

اختیاری: لدر(Ladder)، ۵۰bp و یا ۱۰۰ bp در یکی از چاهک های هر ردیف ران کنید.

- ژل را با ولتاژ 115V AC به مدت ۲۰ (۲۵) دقیقه، یا تا زمانی که محصـولات PCR دو سـوم(۲/۳) از طول ژل را طی کرده باشـند، الکتروفورز کنید.
- منبع تغذیه را خاموش کنید.
- ژل به UV transilluminator انتقال دهید.
- از ژل، بدون سینی ژل، عکس بگیرید.
- عکس را علامت گذاری کنید.

ارزیابی نتایج

محصـولات PCR اختصـاصـی HLA و متعلق به کنترل داخلی، در ژل در زیر نور UV دیده می شـوند. HLA B-5 Primer Mix و HLA B-51حاوی پرایمر های کنترل است که یک قطعه bp ۷۹۶ از هورمون های رشـد انسـانی (HGH) را تکثیر می کنند (در نمونه های غلظت پایین شـما ممکن است یک باند غیر اختصاصی در bp ۱۲۵۰ مشاهده کنید که این باند تاثیری روی تشخیص شما ندارد). غلظت این جفت پرایمر ها کمتر از پرایمر های اختصاصی آلل است . این تکثیر همیشه رخ می دهد و هدف، تایید انجام PCR موفق می باشد. بنابراین باند کنترل می تواند در تمامی واکنش های PCR دیده شود. باند کنترل می تواند ضعیف باشد یا در حضور محصول PCR آلل خاص HLA اصلا دیده نشود که محدودیت نمی باشد. ترکیب پرایمر ها امکان شناسایی فرد مثبت را می دهد. تفسـیر بر اسـاس این اسـت که آیا یک باند خاص در ژل وجود دارد یا خیر. اندازه قطعات DNA تکثیر شـده در هنگام ارزیابی آزمون نیازی نیست که مورد توجه قرار بگیرد، با این وجود ممکن است برای تفسیر آزمون مفید باشد. برای ارزیابی، الگوی باند های خاص به تفسیر ژل توجه شود. نتیجه تایپ با استفاده از الگوی واکنش خوانده می شود.

تفسیر ژل

اندازه(bp)	بدون تکثیر	منفی	مثبت	واکنش
-				چاهک ژل
۷۹۶	None			باند کنترل
۴۵۱	None	None		باند اختصاصی
≤۱۰۰				دایمر پرایمر

شکل ۱: نمودار مختصری از نتایج احتمالی B-51 typing در آنالیز ژل

نکته: در نمونه های غلظت پایین شما ممکن است یک باند غیر اختصاصی در bp ۱۲۵۰ مشاهده کنید که این باند تاثیری روی تشخیص شما ندارد)

اندازه(bp)	بدون تکثیر	منفی	مثبت	واکنش
				چاهک ژل
۷۹۶	None			باند کنترل
۴۰۱	None	None		باند اختصاصی
≤۱۰۰				دایمر پرایمر

شکل ۲: نمودار مختصری از نتایج احتمالی B-5 typing در آنالیز ژل

نکته: در نمونه های غلظت پایین شما ممکن است یک باند غیر اختصاصی در bp ۱۲۵۰ مشاهده کنید که این باند تاثیری روی تشخیص شما ندارد و می توانید آن را نادیده بگیرید.

برای تفسیر نتایج مهم است که آیا باند در ژل وجود دارد یا خیر. ترکیب باند های مثبت، خصوصیات HLA را شناسایی می کند. اندازه قطعات (با استفاده از Ladder) می تواند به تفسیر نتایج کمک کند، اما برای ارزیابی آزمون ضروری نیست. به این ترتیب اطمینان حاصل می شود که نتایج بر اساس باند های مثبت کاذب ناشی از واکنش های غیر اختصاصی یا پرایمرهای اختصاصی که از یک تیوب به دیگری منتقل می شود، نمی باشد.